

УДК 616-006.441

Ж. А. Мішаріна<sup>1</sup>✉, В. В. Сітько<sup>2</sup>, С. В. Клименко<sup>2</sup>, Ж. А. Мінченко<sup>2</sup>, А. І. Курченко<sup>1</sup>,  
Ю. О. Сілаєв<sup>2</sup>, Л. О. Ляшенко<sup>2</sup>, В. М. Полянська<sup>2</sup>, В. Г. Бебешко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, бульвар Т. Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна

<sup>2</sup>Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

## МУС ПЕРЕБУДОВИ ДИФУЗНИХ КРУПНОКЛІТИННИХ В-ЛІМФОМ, ВИЯВЛЕНІ ЗА ДОПОМОГОЮ ІНТЕРФАЗНОЇ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ IN SITU ГІБРИДИЗАЦІЇ

Дифузна крупноклітинна В-лімфома (ДКВЛ) є найбільш поширеним типом лімфом, що включають приблизно 30–40 % всіх В-клітинних неходжкінських лімфом (В-НХЛ). Хромосомні транслокації є відмінною рисою генетичних аберацій при В-лімфомах і часто асоціюються з конкретним підтипом В-НХЛ. Дисрегуляція гену *MYC* внаслідок хромосомних транслокацій, характерна для більшості випадків лімфоми Беркітта (ЛБ).

**Мета роботи.** Підвищення точності діагностики ДКВЛ на підставі визначення змін хромосом 8 та 14, в тому числі транслокації гену *MYC* t(8; 14)(q24; q32) в субстратних клітинах лімфатичних вузлів за допомогою методу трикольорової інтерфазної флуоресцентної in situ гібридизації (I-FISH).

**Матеріали та методи.** Були досліджені препарати біопсійного матеріалу лімфатичних вузлів, зафіксованих в парафіні, 17 хворих на дифузну крупноклітинну В-лімфому і трьох хворих на лімфому Беркітта (в тому числі, одна особа – учасник ліквідації наслідків катастрофи на Чорнобильській АЕС). Вік хворих коливався від 10 до 66 років та складав в середньому (41,3 ± 3,7) року. I-FISH-аналіз проводили з використанням комерційної проби Vysis IGH/MYC, CEP 8 tri-color, dual fusion translocation probe (Abbott Molecular, USA).

**Результати.** У чотирьох із двадцяти осіб було виявлено транслокацію гену *MYC* і генів важких ланцюгів імуноглобуліну (IGH). Встановлено, що метод I-FISH надає можливість ретроспективно визначати перебудови генів *MYC* та *IGH* в субстратних клітинах тканини лімфом, зафіксованих в парафіні.

**Висновок.** За допомогою цього методу виявлені молекулярно-цитогенетичні аномалії у восьми з двадцяти хворих на В-клітинні лімфоми, що дало можливість верифікувати діагноз лімфом, прогнозувати їх клінічний перебіг та підвищити ефективність терапевтичних заходів, в тому числі і при рефрактерних формах.

Ключові слова: дифузна крупноклітинна В-лімфома, лімфома Беркітта, I-FISH.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 310–320.*

J. A. Misharina<sup>1</sup>✉, V. V. Sitko<sup>2</sup>, S. V. Klymenko<sup>2</sup>, J. A. Minchenko<sup>2</sup>, A. I. Kurchenko<sup>1</sup>, Y. O. Silaev<sup>2</sup>,  
L. O. Lyashenko<sup>2</sup>, V. M. Polyanska<sup>2</sup>, V. G. Bebeshko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Medical University O.O. Bohomolets, boulevard T. Shevchenko, 13, Kiev, 01601, Ukraine

<sup>2</sup>State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

## *MYC* gene rearrangements detected by interphase fluorescence in situ hybridization in diffuse large B-cell lymphomas

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of lymphoma, including approximately 30–40% of all B-cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL). Chromosomal translocations are the hallmark of genetic aberrations in B-lymphoma and are often associated with a specific subtype of B-NHL. *MYC* gene dysregulation due to chromosomal translocations is characteristic for the most cases of Burkitt's lymphoma.

✉ Мішаріна Жанна Анатоліївна, e-mail: jmisharina@ya.ru

**Objective.** The goal of this study was to improve the diagnostic accuracy of DLBCL. Identification of chromosome 8 and 14 abnormalities including the translocation of *MYC* gene t(8; 14)(q24; q32) in substrate cells of lymph nodes was applied using the method of tri-color interphase fluorescence in situ hybridization (I-FISH).

**Materials and methods.** Lymph node biopsy specimens of 17 patients with diffuse large B-cell lymphoma and three patients with Burkitt's lymphoma (including one participant of liquidation of consequences of the catastrophe at the Chernobyl NPP) were studied. The age of patients ranged from 10 to 66 years old ( $41.3 \pm 3.7$  average). Biopsy specimens fixed in paraffin. I-FISH-analysis was performed using the commercial test Vysis IGH/*MYC*, CEP 8 tri-color, dual fusion translocation probe (Abbott Molecular, USA).

**Results and conclusions.** *MYC* gene and immunoglobulin heavy chain (IGH) gene translocations were found in four out of twenty persons. Consequently the I-FISH method allows identification of *MYC* and *IGH* gene rearrangements in tissue cells substrate of lymphoma fixed in paraffin. Using this method the molecular-cytogenetic abnormalities were found in eight of twenty patients with B-cell lymphoma providing verification of the lymphoma diagnosis, prediction of their clinical course and advance in management i.e increase the effectiveness of therapy, in refractory lymphoma cases among others.

**Key words:** diffuse large B-cell lymphoma, Burkitt's lymphoma, I-FISH method.

*Problems of radiation medicine and radiobiology. 2014;19:310-320.*

Дифузна крупноклітинна В-лімфома (ДКВЛ) є найбільш поширеним типом лімфом, що включають приблизно 30–40 % всіх В-клітинних неходжкінських лімфом (В-НХЛ). Молекулярно-цитогенетичні аномалії є відмінною рисою генетичних аберацій при В-лімфомах, які можуть суттєво впливати на перебіг та вибір тактики лікування даної патології. Характерною генетичною ознакою ДКВЛ є різноманітність та значна варіабельність хромосомних порушень в пухлинних клітинах [1]. В більшості випадків хромосомні аберації представлені ампліфікаціями, транслокаціями, делеціями, інверсіями, гіпер- та гіпоанеуплоїдіями певних хромосом [2]. Крім того, з'ясовано, що дисрегуляція онкогенів із залученням генів важких ланцюгів IGH нерідко супроводжується транслокаціями, які мають ключове значення у розвитку лімфатичних пухлин [3–4].

На сьогодні встановлено, що переважна більшість лімфом Беркітта (ЛБ) у хворих характеризується наявністю транслокації t(8; 14)(q24; q32) із залученням гену *C-MYC* (*MYC*) [5]. Дисрегуляція гену *MYC* внаслідок хромосомної транслокації може сприяти збільшенню та/або поширенню пухлинних клітин в організмі хворого. Дана транслокація формується в результаті порушення регуляції активності протоонкогена *MYC*, ключового фактора транскрипції, із залученням локусу гена важкого ланцюга імуноглобуліну IGH, який розташований на хромосомі 14 (регіон 14q32). Значно рідше зустрічаються варіантні транслокації t(8; 22)(q24; q11) IGL/*MYC* і t(2; 8)(p12; q24) IGK/*MYC* – перебудови локусів *MYC* і генів легких ланцюгів імуноглобулінів [6]. Згідно даних літератури, надлишкова експресія гену *MYC* призводить до клітинної проліферації, диференціації та розвитку

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of lymphoma, including approximately 30–40 % of all B-cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL). Molecular and cytogenetic abnormalities are the hallmark of genetic aberrations in B-lymphoma, which can significantly influence the natural history of disease and choice of treatment strategy. Considerable variability of chromosomal abnormalities in tumor cells is a characteristic feature of the genetic diversity of DLBCL [1]. There are such chromosomal aberrations as amplification, translocations, deletions, inversions, hyper- and hypoaneuploidy of certain chromosomes in most cases [2]. Moreover, it was found that oncogene dysregulation involving heavy chain (IGH) gene is often accompanied by translocations, which have a key role in the development of lymphatic tumors [3–4].

Nowadays it is found that the vast majority of Burkitt lymphoma cases (BL) is characterized by translocation of t(8; 14) (q24; q32) involving *C-MYC* (*MYC*) gene [5]. *MYC* gene dysregulation due to chromosomal translocations can promote the cancer cells growth and/or spread around the body. This translocation occurs as a result of dysregulation of *MYC* protooncogene activity, a key transcription factor, involving locus of the immunoglobulin heavy chain IGH gene located on chromosome 14 (region 14q32). Such translocations as t(8; 22) (q24; q11) IGL/*MYC* and t(2,8) (p12; q24) IGK/*MYC* – rearrangements of *MYC* gene loci and immunoglobulin light chains gene are less common [6]. According to the literature the excess of *MYC* gene expression induces the cell proliferation, differentiation and neoplasia devel-

неоплазії [7]. *MYC* транслокації є складними та пізніми подіями, що лежать в основі прогресії захворювання. Їх виявляють в 80–90 % випадків лімфоми Беркітта, а також вони можуть спостерігатися в 5–15 % випадків у хворих на ДКВЛ [8–9]. Такі хворі мають гірший прогноз щодо перебігу захворювання в порівнянні з *MYC* негативними пацієнтами і незадовільну відповідь на проведену терапію [10–11]. Ідентифікація *MYC* транслокації у хворих з підозрою на ДКВЛ є важливою складовою діагностичного обстеження, що може сприяти вибору ефективних терапевтичних заходів та прогнозуванню клінічного перебігу даного захворювання.

### МЕТА РОБОТИ

Підвищення точності діагностики ДКВЛ на підставі визначення змін хромосом 8 та 14, в тому числі транслокації гену *MYC* t(8; 14)(q24; q32) в субстратних клітинах лімфатичних вузлів за допомогою методу триколірової інтерфазної флуоресцентної *in situ* гібридизації (I-FISH).

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Були досліджені препарати біопсійного матеріалу лімфатичних вузлів, зафіксованих в парафіні, 17 хворих на дифузну крупноклітинну В-лімфому і трьох хворих на лімфому Беркітта (в тому числі, одна особа – учасник ліквідації наслідків катастрофи на Чорнобильській АЕС). Вік хворих коливався від 10 до 66 років та складав в середньому ( $41,3 \pm 3,7$ ) року. Молекулярно-цитогенетичні дослідження виконувались у відділі гематології та трансплантології ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України” (ННЦРМ).

Молекулярно-цитогенетичні дослідження здійснювали за допомогою триколірової I-FISH на зразках клітин біопсійного матеріалу лімфатичних вузлів, зафіксованих в парафіні. Дослідження, проводились з використанням комерційної проби Vysis IGH/MYC, CEP 8 tri-color, dual fusion translocation probe (Abbott Molecular, USA). Зонд призначений для виявлення транслокації t(8; 14)(q24; q32) із залученням IGH регіону (розмір ~1,6 Mb, мічений флюорохромом зеленого кольору – SpectrumGreen) і гену *C-MYC*. Ген *MYC* розташований на хромосомі 8 (8q24), гібридує ~821 kb і мічений флюорохромом червоного кольору – SpectrumOrange. Проба до центромери хромосоми 8 (регіон 8p11.1- q11.1) CEP 8 мічена флюорохромом блакитного кольору – SpectrumAqua і слугувала індикатором хромосоми 8, що дозволяло ідентифікувати її кількісні зміни.

oment [7]. *MYC* translocations are complex and late events underlying the disease progression. They are found in 80–90 % of cases of Burkitt’s lymphoma and may occur in 5–15 % of patients with DLBCL [8–9]. Such patients have a worse prognosis of the disease and poor response to treatment compared with *MYC*-negative patients [10–11]. Identification of *MYC* translocation in suspected DLBCL is an important component of diagnostic examination and testing of a patient that can facilitate the choice of effective therapeutic interventions and predicting of clinical course of the disease.

### OBJECTIVE

The goal of this study was to improve the diagnostic accuracy of DLBCL through identification of chromosome 8 and 14 abnormalities including the translocation of *MYC* gene t(8; 14)(q24; q32) in lymph node cell substrate using the method of tri-color interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH).

### MATERIALS AND METHODS

Lymph node biopsy specimens of 17 patients with diffuse large B-cell lymphoma and three patients with Burkitt’s lymphoma (including one participant of liquidation of consequences of the catastrophe at the Chernobyl NPP) were studied. Biopsy specimens fixed in paraffin. The age of patients ranged from 10 to 66 years old ( $41.3 \pm 3.7$  average). Molecular cytogenetic studies were performed in the Department of Hematology and Transplantology of NRCRM NAMS of Ukraine.

Molecular cytogenetic study was carried out using a tri-color I-FISH on cell samples of lymph nodes biopsy material fixed in paraffin. Studies were conducted using the commercial test Vysis IGH/MYC, CEP 8 tri-color, dual fusion translocation probe (Abbott Molecular, USA). The probe was designed to detect the translocation of t(8;14)(q24; q32) involving IGH region (size ~1,6 Mb, labeled by green fluorochrome – SpectrumGreen) and *C-MYC* gene. *MYC* gene is located on chromosome 8 (8q24), hybridizes ~821 kb and is labeled with red fluorochrome – SpectrumOrange. Probe to the centromere of chromosome 8 (region 8p11.1- q11.1) CEP 8 was labeled with blue fluorochrome – SpectrumAqua and served as indicator of chromosome 8, providing the identification of its quantitative changes.

Для проведення I-FISH на зразках клітин лімфатичних вузлів використовували тонкі зрізи (2–4 мкм) з фіксованої в парафіні тканини на скельцях з покриттям полі-L-лізину. Після депарафінізації (дві зміни ксилолу по 10 хвилин) зрізи поміщали в цитратний буфер в скороварку “Приготування на пару” на 20 хвилин з подальшою регідратацією в спиртах низхідних концентрацій. Далі проводили ферментативну обробку проназою при 37 °C протягом 2 хвилин з наступним промиванням зрізів в розчині 2 x SSC. Висушували зрізи при кімнатній температурі. Після гібридизації з пробою, на препарат наносили контрастуючий розчин DAPI II (Vysis, США).

Детекцію результатів проводили на програмно-апаратному комплексі CytoVision (Applied Imaging, UK) на базі мікроскопа Olympus BX51 (Японія) з використанням фільтрів: DAPI/ORANGE/GREEN/AQUA.

В ядрі нормальної клітини реєстрували два червоних (хромосома 8), два зелених (хромосома 14) і два блакитних сигнали (центромера хромосоми 8). За наявності транслокації t(8; 14)(q24; q32) в ядрах визначали один червоний, один зелений і два змішаних зелено-червоних сигнали хромосом 8 і 14 та два блакитних сигнали.

Для визначення меж норми для проби Vysis IGH/MYC, CEP 8 tri-color, dual fusion translocation probe було проаналізовано не менше 1000 ядер лімфоцитів кісткового мозку кожного з п'яти практично здорових донорів. В проаналізованих ядрах практично здорових донорів транслокації t(8; 14)(q24; q32) не визначено.

Статистична обробка даних проводилася за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В таблиці 1 наведена інформація про хворих на ДКВЛ, їх імунологічні та молекулярно-цитогенетичні показники. Показники експресії Ki-67 у 10 хворих на ДКВЛ перевищували 85 %. Висока проліферативна активність пухлинних клітин Ki-67 спостерігалась у всіх трьох хворих на ЛБ. Як показано в таблиці 1, імунологічні маркери також визначалися у більшості пацієнтів. У пухлинних клітинах усіх хворих на ДКВЛ і ЛБ зареєстрована виражена експресія маркерів CD20 і PAX 5 та була відсутня експресія для CD 3 лімфоцитів. BCL 2 був позитивним у трьох із восьми випадків зазначених лімфом, які супроводжувались перебудовами генів MYC та IGH. Варто відмітити, що клітини лімфом несли позитивну реакцію на CD 10 у всіх хворих, крім одного

Thin slices (2–4 μm) of lymph node specimens were prepared using the tissue fixed in paraffin on glass slides and coated with poly-L-lysine. After dewaxing (two changes of xylene for 10 minutes) the sections were placed in citrate buffer in a “Steaming” pressure cooker for 20 minutes, followed by rehydration in a descending alcohol concentrations. Further enzymatic processing with pronase was performed at 37°C for 2 minutes, followed by washing of the sections in a solution of 2 x SSC. Sections were dried at a room temperature. After hybridization with the sample a contrasting solution DAPI II (Vysis, USA) was applied on the specimen.

Detection of results was performed at the CytoVision (Prospect Applied Imaging, UK) hardware and software suite based on Olympus BX51 microscope, Japan using the DAPI/ORANGE/GREEN/AQUA filters.

Two red (chromosome 8), two green (chromosome 14) and two blue signals (centromere of chromosome 8) were registered in the normal cell nuclei. One red, one green and two mixed green and red signals of chromosomes 8 and 14 and two blue signals were registered in nuclei in the presence of t(8;14)(q24; q32) translocation.

To determine the normal range for Vysis IGH/MYC, CEP 8 tri-color, dual fusion translocation probe at least 1,000 bone marrow lymphocyte nuclei from each 5 apparently healthy donors were analyzed. No t(8;14) (q24; q32) translocation were found in the nuclei from apparently healthy donors.

Statistical data analysis was carried out in Statistica 6.0 software.

## RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 presents data for patients including immunological and molecular cytogenetic parameters in DLBCL and BL. Ki-67 expression exceeded 85% in 10 patients with DLBCL. High proliferative activity of Ki-67 tumor cells was observed in all three patients with LB. Immunologic markers were also identified in most patients, as shown in Table 1. Pronounced expression of markers CD20 and PAX 5 was registered in tumor cells of all DLBCL and BL patients. At that there was no expression for CD 3 lymphocytes. BCL 2 was positive in three of the eight cases of lymphomas, accompanied by MYC and IGH gene rearrangements. Noteworthy there was a positive reaction to the CD 10 in lymphoma cells from all patients



**Таблиця 1**  
Клініко-патологічні характеристики хворих на ДКВЛ і ЛБ із урахуванням статусу гену *MYC*  
**Table 1**  
Clinicopathological characteristics of DLBCL and BL patients stratified by *MYC* rearrangement status

Випадки Cases	Вік/Стать Age/gender	Стадія захворювання Stage of disease	Гістологічний тип пухлини Histological type of tumor	Імуногістохімічні дослідження										I-FISH дослідження / I-FISH analysis			
				CD 3	CD 10	CD 20	PAX 5	BCL 2	BCL 6	Ki-67, %	Транслокації IGH/ <i>MYC</i> , %	Анеуплоїдії хромосом 8 та 14, %					
				Immunohistochemistry analysis										IGH/ <i>MYC</i> translocations, %		Aneuploidy of chromosomes 8 and 14, %	
1	41/ч/М	IV B	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	85	32	68	
2	52/ж/Ф	II A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	85	0	0	
3	21/ч/М	II A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	97	0	0	
4	60/ж/Ф	II A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	90	0	18	
5	34/ч/М	IV B	ЛБ/BL	-	+	+	+	-	+	+	+	+	100	0	0		
6	63/ж/Ф	II A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	-	+	+	+	+	85	0	80		
7	38/ч/М	II B	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	+	+	-	+	+	70	0	60		
8	49/ч/М	I A	ДКВЛ/DLBCL	-	-	+	+	+	+	-	-	+	40	0	0		
9	25/ж/Ф	II A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	90	0	0		
10	66/ч/М	II A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	90	0	0		
11	48/ж/Ф	IV B	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	-	+	+	+	+	90	93	78		
12	10/ч/М	IV B	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	-	+	+	+	+	80	0	0		
13	17/ч/М	II A	ЛБ/BL	-	+	+	+	+	+	+	-	+	100	80	0		
14	58/ч/М	II A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	-	+	+	+	+	75	0	0		
15	48/ч/М	II A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	70	0	0		
16	50/ж/Ф	II A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	85	0	35		
17	21/ч/М	II B	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	+	+	-	+	+	80	0	0		
18	30/ж/Ф	II A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	85	0	0		
19	36/ч/М	I A	ДКВЛ/DLBCL	-	+	+	+	+	+	-	+	+	65	0	0		
20	58/ж/Ф	II A	ЛБ/BL	-	+	+	+	+	+	-	+	+	90	67	0		

Примітка. ДКВЛ – дифузна крупноклітинна В-лімфома, ЛБ – Лімфома Беркітта, Ч – чоловіча стать, Ж – жіноча стать, 0 – не виявлено аберацій хромосом.  
Note. DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma, BL – Burkitt lymphoma, М – male, F – female, 0 – not detected chromosomal aberrations.

випадку. BCL 6 був позитивним у семи з восьми хворих на лімфоми із зареєстрованими перебудовами генів *MYC* та *IGH*.

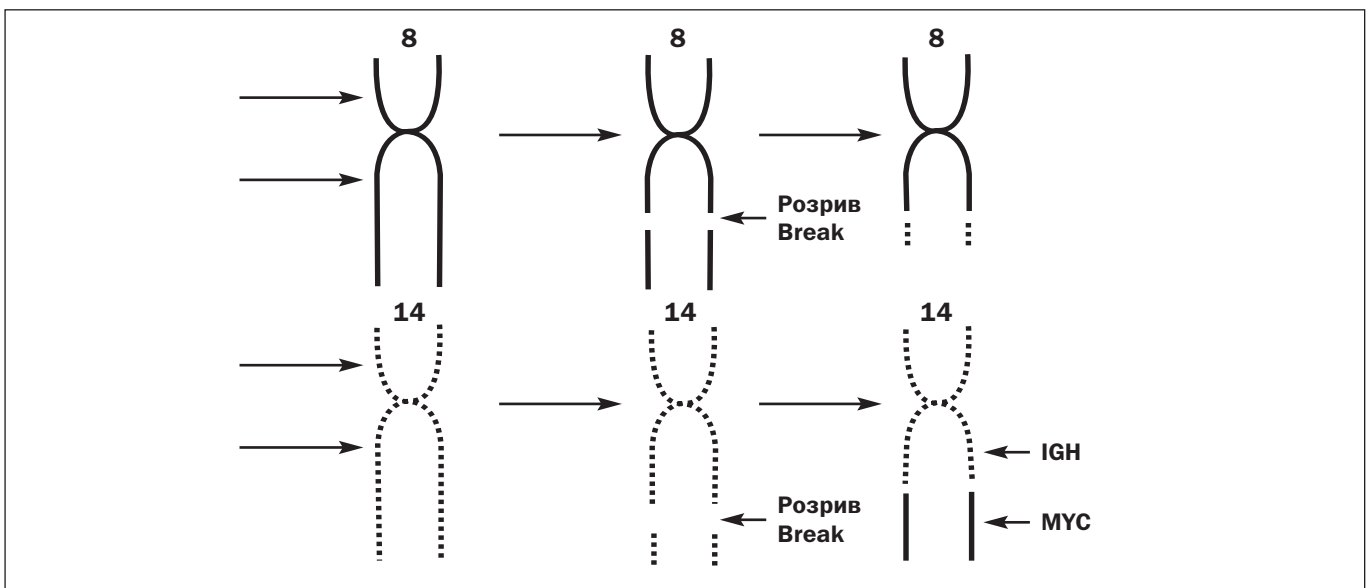
При молекулярно-цитогенетичному дослідженні біопсійного матеріалу лімфатичних вузлів було виявлено транслокацію гену *MYC* в локусі гену важких ланцюгів імуноглобуліну у чотирьох із двадцяти осіб. В ядрах субстратних клітин цих хворих відзначалися один червоний, один зелений і два змішаних зелено-червоних сигнали хромосом 8 і 14 та два блакитних сигнали на центромерних ділянках хромосоми 8, що свідчить про наявність генетичної перебудови із залученням хромосом 8 та 14 (рис. 1). У двох хворих на ЛБ мала місце транслокація  $t(8; 14)(q24; q32)$ , яка реєструвалась у 80 і 67 % клітин відповідно. Ще у одного хворого цитогенетичні зміни не визначались. *MYC* транслокації були ідентифіковані у двох хворих на ДКВЛ відповідно у 32 і 93 % клітин, які, крім того, супроводжувались різними варіантами гіперанеуплоїдії (збільшення кількості від одного до чотирнадцяти червоних, зелених та блакитних сигналів). З найбільшою вірогідністю, картина гібридизації, що була виявлена в даному випадку в субстратних клітинах хворих, обумовлена наявністю полісомії хромосом 8 та 14. Загалом анеуплоїдії хромосом 8 та 14 визначались у шести з двадцяти обстежених нами хворих. Слід відмітити, що ампліфікація гену *MYC* у хворих не реєструвалась.

Ретроспективно нами була проведена оцінка 17 випадків ДКВЛ і трьох випадків ЛБ з атиповою морфо-

except one case. BCL 6 was positive in seven of eight patients with lymphoma where *MYC* and *IGH* gene rearrangements were registered.

*MYC* gene translocation in the immunoglobulin heavy chain gene locus (*IGH*) was found in four out of twenty people. One red, one green and two mixed green and red signals of chromosomes 8 and 14 and two blue signals on centromere sites of chromosome 8, indicating the presence of genetic rearrangements involving chromosomes 8 and 14 were found in the substrate cell nuclei (Fig. 1). There was a  $t(8;14)(q24; q32)$  translocation in two patients with BL, which was recorded in 80% and 67% of cells respectively. In another one patient the cytogenetic changes were not defined. *MYC* translocations were identified in two DLBCL patients (32% and 93% of the cells respectively), accompanied by a range of hyperaneuploidy types i.e. increasing the number of red, green and blue signals from 1 to 14. Hybridization pattern found in substrate cells of patients in this case with the utmost probability was due to the presence of chromosome 8 and 14 polysomy. Total aneuploidy of 8 and 14 chromosomes was found in six of twenty surveyed patients. It is noteworthy that no *MYC* gene amplification was registered.

Thus, we had retrospectively evaluated 17 DLBCL cases and three BL cases with atypical tumor cell



**Рисунок 1.** Схематичне зображення реципрокної транслокації за участю хромосом 8 і 14.

Кінець плеча 8-ї хромосоми переходить до 14-ї хромосоми, гомологічний фрагмент хромосоми 14 переходить до 8-ї хромосоми. Ген *MYC* знаходиться на тому сегменті хромосоми 8, який потрапляє на хромосому 14, він вбудовується вслід за *IGH* генами і активується.

**Figure 1.** Schematic representation of reciprocal translocations involving chromosomes 8 and 14.

End of the arm of chromosome 8 passes to the 14<sup>th</sup> chromosome, homologous fragment of chromosome 14 moves to 8<sup>th</sup> chromosome. *MYC* gene is located on that segment of chromosome 8, which falls on chromosome 14. It is embeds after the *IGH* gene and becomes activated.

логією пухлинних клітин. *MYC* перебудови найчастіше рееструвались за ЛБ (у двох із трьох хворих), в той же час, транслокація  $t(8; 14)(q24; q32)$  визначалась лише в поодиноких випадках у хворих на ДКВЛ (у двох із сімнадцяти). Крім того, в субстратних клітинах цих лімфом мали місце генетичні аномалії хромосом, які були представлені як гіпер-, так і гіпоанеуплоїдіями. Дане дослідження показує, що ці генетичні аберації хромосом можуть бути пов'язані з атиповою морфологією субстратних клітин при В-клітинних лімфомах. Тому, ми вирішили надати клінічну, імунологічну та цитогенетичну характеристику одного з обстежених хворих, у якого було виявлено транслокацію гену *MYC*  $t(8; 14)(q24; q32)$  і аберації хромосом 8 та 14.

#### Опис окремого клінічного випадку

Хворий М. (чоловік) 1972 р. н., № історії хвороби 6125, в 2012 р. був госпіталізований для дообстеження та лікування у відділення онкогематології Національного інституту раку (НІР). Хворий мав скарги на виражену загальну слабкість, головокружіння, болі в області ребер зліва. Загальний стан середнього ступеня тяжкості, шкіра, слизові бліді, вологі, чисті. Периферичні лімфовузли не пальпувалися. Артеріальний тиск 115/80 мм рт. ст. Розміри печінки не збільшені, селезінка видалена (спленектомія в НІР в серпні 2012 р.).

Діагноз В-крупноклітинна неходжкінська лімфома IV В ст. встановлений в НІР 10.09.2012 р. за результатами патогістологічного (ПГД) № 39421-31/12 (27.08.2012) та імуногістохімічного досліджень (ІГХД) від 04.09.2012.

В досліджуваному матеріалі, спостерігалось розростання пухлини дифузного типу росту. Склад пухлинних клітин поліморфний. Основна маса їх мала великий розмір з округлими та овальними ядрами, двома-трьома ядерцями, що локалізувались біля ядерної мембрани. Зустрічались гістіоцити, багато дистрофічно змінених форм з анаплазованими ядрами, виявлялись поодинокі імунобласти (рис. 2). При ІГХД ідентифікувалась мономорфна мембрана і цитоплазматична експресія CD 20 та BCL-2. BCL-6 експресувалась більшістю пухлинних клітин. Маркер проліферативної активності Ki-67 складав 85 %. Дані гістологічного та імуногістохімічного досліджень свідчать, що у хворого мала місце дифузна В-крупноклітинна лімфома, герміногенного походження (табл. 2).

Хворому М. було проведено 6 курсів поліхіміотерапії (ПХТ) за схемою R-CHOP. Повної відповіді за даними позитронно-емісійної томографії (ПЕТ) до-

morphology. *MYC* rearrangements were registered most often in BL (in two out of three patients), at the same time a  $t(8; 14)(q24; q32)$  translocation was identified just in few cases in DLBCL patients (two out of seventeen). Moreover, there were some genetic abnormalities of chromosomes represented both as hyper- and hypoaneuploidy in the lymphoma substrate cells. This study shows that the described genetic aberrations of chromosomes may be associated with atypical morphology of substrate cells in B-cell lymphomas. Therefore, we decided to provide clinical, immunological and cytogenetic characterization of one patient with *MYC* gene  $t(8; 14)(q24; q32)$  translocation and chromosome 8 and 14 aberrations.

#### Description of individual clinical case

Patient M. (male), born in 1972, the case history #6125. Was admitted to hospital in 2012 for a follow-up examination and treatment in the oncology department of the National Cancer Institute (NCI). The patient complained of the weakness, dizziness, and pain in the ribs on the left. His general state was of moderate severity. The skin and mucosae were pale, moist and clean. Peripheral lymph nodes were not palpable. Arterial blood pressure was 115/80 mm Hg. There was no hepatomegaly. Splenectomy was carried out at the NCI in August 2012.

Diagnosis of non-Hodgkin's large B-cell lymphoma in the stage IV B was established at the NCI (10/09/2012) according to the results of histopathological study #39421-31 / 12 (27.08.2012) and immunohistochemical (IHC) assay (04.09.2012).

There was a proliferation of diffuse-type tumor growth in the studied material, along with polymorphic composition of tumor cells. Most of them had large, rounded and oval nuclei, two or three nucleoli, which were located near the nuclear membrane. There were histiocytes, many dystrophic forms of anaplastic nuclei, immunoblasts were rare (Fig. 2). Under the IHC a monomorphic membrane and cytoplasmic expression of CD 20 and BCL-2 were identified. BCL-6 were expressed by the majority of tumor cells. Proliferative activity marker Ki-67 value was 85 %. These histological and immunohistochemical studies indicate the diffuse large B-cell lymphoma of germ cell origin (Table 2).

The patient M. had received 6 cycles of polychemotherapy (PChT) according to R-CHOP protocol. No complete response according to positron

**Таблиця 2**

**Дані імуногістохімічного дослідження № 773/13 хворого М.**

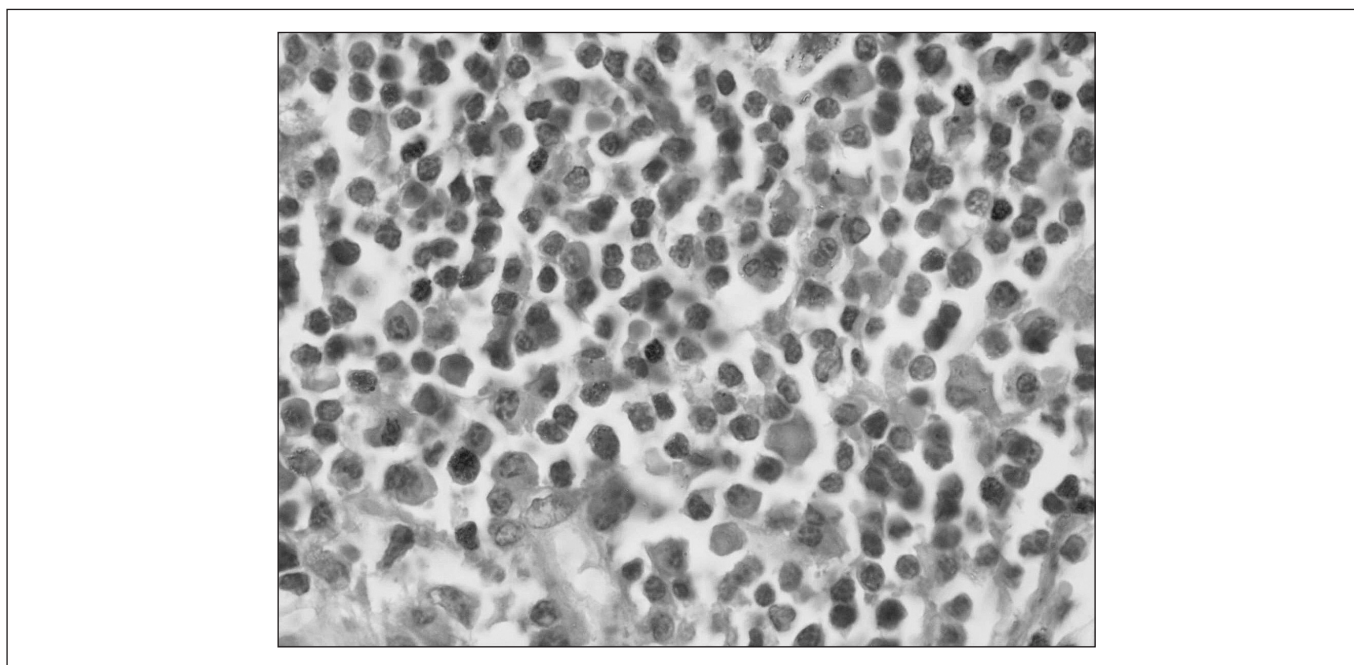
**Table 2**

**These immunohistochemical study № 773/13 patient M.**

Маркер / marker	Оцінка реакції Assessment of response
<b>CD 20cy</b> (Dako IS604, Monoclonal Mouse Anti-Human, Clone L26)	"+"
Monoclonal Rabbit Anti-Human <b>CD 5</b> Clone SP19 (Dako IS081)	"_"
Dako IS614 Monoclonal Mouse Anti-Human <b>BCL 2</b> Oncoprotein Clone 124	"+"
Dako Monoclonal Mouse Anti-Human <b>BCL 6</b> Oncoprotein Clone PG-B6p	"+"
<b>Ki-67 Antigen</b> (Dako IS626 Monoclonal Mouse Anti-Human Clone MIB-1)	85 %
Monoclonal Mouse Anti-Human <b>CD 10</b> Clone 56C6 (Dako IS648)	"+"
<b>CD 3</b> (Dako IS503, Polyclonal Rabbit Anti-Human)	"_"
<b>B-cell-Specifik Activator Protein</b> (Dako IS650 Monoclonal Mouse Anti-Human, Clone <b>DAK-Pax5</b> )	"+"

сягнуто не було. На початку березня 2013 р. хворий М. помітив зміни в області ребер зліва. В подальшому при рентгенологічному дослідженні була визначена деструкція 10-го ребра і встановлено загострення основного захворювання з ураженням шлунку, зачеревних та мезентеріальних лімфовузлів. З цього приводу хворий отримав 2 курси хіміотерапії DHAP та був проконсультований в Київському центрі трансплантації кісткового мозку (КЦТКМ) щодо можливості проведення високодозової хіміотерапії (ВДХТ) з аллогенною трансплантацією кісткового мозку (АТКМ). В анамнезі у хворого було визначено хронічний вірусний гепатит С (RNA HCV+, генотип I, 2004р.).

emission tomography (PET) was achieved. In early March 2013 the patient noticed some symptoms in the rib area on the left. Later the destruction of the 10<sup>th</sup> rib was revealed by X-ray examination and exacerbation of underlying disease was established with stomach, and retroperitoneal and mesenteric lymph nodes involvement. In this regard the patient had received 2 cycles of chemotherapy (DHAP protocol) and was advised in Kiev center of Bone Marrow Transplantation (KCBMT) about the possibility of high-dose chemotherapy (VDHT) with allogenic bone marrow transplantation (ABMT). There was chronic viral hepatitis C infection (RNA HCV+, genotype I, 2004) in the history of the patient.



**Рисунок 2. Гістологічні особливості лімфатичного вузла хворого М. на ДКВЛ, № історії хвороби 6125**

**Figure 2. Histological features of lymph node in patient M. DLBCL, case history #6125**



Хворому М. було призначено лікування згідно зі стандартами та локальними протоколами.

З 03–06.05.2013 проводилась ПХТ по ДНАР: цисплатин 200 мг в/в (1), цитозар 4000 мг 2 р/д (2), дексаметазон 40 мг/д в/в (1–4), інфузія 6000 мл/24 год в/в (1–4), гемотрансфузія ер/маси (18.05.2013, 20.05.2013), котролок 40 мг х2р/д в/в, но-спа.

22.05–24.05.2013 проведена променева терапія на область ребер зліва з метою знеболення (8 Гр). За результатами лікування стан пацієнта та гемограма покращились.

У липні 2013 р. хворому було проведено молекулярно-цитогенетичне дослідження з використанням інтерфазної FISH на зразках клітин зрізів парафінізованих блоків біопсійного матеріалу лімфатичних вузлів у відділі гематології та трансплантології ННЦРМ. З метою визначення ампліфікації гена *C-MYC* та можливої транслокації  $t(8; 14)(q24; q32)$  була застосована проба LSI IGH/MYC, CEP 8 tri-color, dual fusion translocation probe (Abbott Molecular, USA). Було проаналізовано 100 інтерфазних ядер субстратних клітин та визначено декілька клонів з різними аномаліями. У більшості (68 %) проаналізованих клітин відзначалася гіперанеуплоїдія хромосом 8 та 14 – реєструвалися додаткові червоний (ген *MYC*) або зелений (ген *IGH*) сигнали (збільшення кількості від одного до дев'яти червоних або зелених сигналів). Ці зміни хромосом суттєво перевищували нормативні значення (10 %) і свідчили про клональний характер пухлини. В решті ядер (32 %) визначено два злитих зелено-червоних сигнали, один зелений, один червоний та два блакитних сигнали, котрі відповідають транслокації  $t(8; 14)(q24; q32)$ .

Таким чином, у пацієнта були зареєстровані комплексні зміни хромосом 8 та 14 з наявністю декількох клонів аномальних клітин.

Підсумовуючи вищенаведене, необхідно зазначити, що за результатами гістологічного та імуногістохімічного досліджень хворому було встановлено діагноз – дифузна В-крупноклітинна лімфома, герміногенного походження. Проте особливості перебігу захворювання, резистентність до ПХТ та наявність комплексних генетичних змін, в тому числі транслокації  $t(8; 14)(q24; q32)$ , дали підставу клініцистам для перегляду ПХТ, провести коригування програми лікування та призначити ДНАР терапію.

Отже, виявлення транслокації гену *MYC* в субстратних клітинах хворих на В-клітинні лімфоми є одним з основних діагностичних критеріїв щодо

The patient was prescribed a treatment according to local standards and protocols.

On 03–06.05.2013 the PChT (DHAP protocol) was applied i.e. cisplatin 200 mg IV (1), cytosar 4000 mg BID (2), dexamethasone 40 mg/d IV (1–4), 6000 mL/24h IV infusion rate (1–4), RBC concentrate transfusions on 18/05/2013, 05/20/2013, Controloc 40 mg BID and No-Spa.

On 22.05–24.05.2013 the 8 Gy radiation therapy was conducted to the rib area the on the left (for pain control). Upon treatment the status of the patient improved and hemogram indices became better.

In July 2013 a molecular cytogenetic studies using interphase FISH on samples of the cell block sections of lymph node biopsy material fixed in paraffin were conducted in the Department of Hematology and Transplantology, NRCRM NAMS of Ukraine. To determine the amplification of the *C-MYC* gene and possible  $t(8; 14)(q24; q32)$  translocation the LSI IGH/MYC, CEP 8 tri-color, dual fusion translocation probe (Prospect Abbott Molecular, USA) was applied. One hundred interphase nuclei of substrate cells were analyzed resulted in identification of several clones with a range of anomalies. In the majority (68%) of analyzed cells the hyperaneuploidy of chromosomes 8 and 14 was observed as the additional red (*MYC* gene) or green (*IGH* gene) signals (increasing the number from 1 to 9 red or green signals) were recorded. These chromosome abnormalities significantly exceeded the normative values (10%) indicating the clonal character of the tumor. In other nuclei (32%) two fused green and red signals, one green, one red and two blue signals were recorded corresponding to  $t(8; 14)(q24; q32)$  translocations.

Thus, some complex changes of chromosomes 8 and 14 with the presence of multiple clones of abnormal cells were recorded in the patient.

To sum up, it should be noted that the results of histological and immunohistochemical studies the patient was diagnosed a diffuse large B-cell lymphoma of germ cell origin. However, the natural history the disease and case history with resistance to PChT in particular and presence of complex genetic alterations including  $t(8; 14)(q24; q32)$  translocation stipulated the review of PCT to adjust the treatment protocol and DHAP therapy schedule.

Thus, identification of *MYC* gene translocations in substrate cells of patients with B-cell lymphoma is one of the principal diagnostic criteria for verifi-

верифікації діагнозу ДКВЛ й ЛБ, та дає можливість лікарю оптимізувати тактику лікування для подолання резистентності до сучасних програм ПХТ.

## ВИСНОВКИ

Встановлено, що метод I-FISH дозволяє ретроспективно визначати перебудови генів *MYC* і *IGH* в субстратних клітинах тканини лімфом, зафіксованих в парафін, в тому числі у осіб, які постраждали внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС.

За допомогою цього методу виявлені молекулярно-цитогенетичні аномалії у восьми з двадцяти хворих на В-клітинні лімфоми, що дало можливість верифікувати діагноз лімфом, прогнозувати їх клінічний перебіг та підвищити ефективність терапевтичних заходів, при рефрактерних формах — включно.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. IG/*MYC* rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas / A. Valera O. Balague, L. Colomo [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2010. – Vol. 34, No. 11. – P. 1686–1694.
2. Detection of cryptic and variant *IGH-MYC* rearrangements in high-grade non-Hodgkin's lymphoma by fluorescence in situ hybridization: implications for cytogenetic testing / P. C. May, N. Foot, R. Dunn [et al.] // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2010. – Vol. 198, No. 1. – P. 71–75.
3. *IGH* amplification in patients with B cell lymphoma unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B cell lymphoma and Burkitt's lymphoma / M. Bellone, A. L. Zaslav, T. Ahmed [et al.] // *Biomark. Res.* – 2014. – Vol. 2. – P. 9.
4. Rearrangements of *MYC* gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP / A. Tzankov, Z. Y. Xu-Monette, M. Gerhard [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2014. – Vol. 27, No. 7. – P. 958–971.
5. C-*MYC* Aberrations as Prognostic Factors in Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Meta-Analysis of Epidemiological Studies / K. Zhou, D. Xu, Y. Cao [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, No. 4. – P. e95020.
6. *MYC* rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas / M. Ladanyi, K. Offit, S. C. Jhanwar [et al.] // *Blood.* – 1991. – Vol. 77, No. 5. – P. 1057–1063.
7. Clinical relevance of *BCL2*, *BCL6*, and *MYC* rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma / M. H. Kramer, J. Hermans, E. Wijburg [et al.] // *Blood.* – 1998. – Vol. 92, No. 9. – P. 3152–3162.
8. Lymphoma / leukemia molecular profiling project. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma / S. S. Dave, K. Fu, G. W. Wright [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 354, No. 23. – P. 2431–2442.
9. *MYC* gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy / K. J. Savage, A. J. Johnson, S. Ben-Neriah [et al.] // *Blood.* – 2009. – Vol. 114. – P. 3533–3537.

cation of DLBCL and BL diagnosis. It enables the treatment strategy optimization to overcome the resistance to current PChT protocols.

## CONCLUSIONS

I-FISH method allows to determine retrospectively the of *MYC* and *IGH* gene rearrangement in substrate cells of lymphoma tissue fixed in paraffin. Method is especially applicable in the Chernobyl NPP survivors.

Using this method, the molecular-cytogenetic abnormalities were revealed in eight of twenty patients with B-cell lymphoma providing verification of lymphoma diagnosis, prediction of disease clinical course, and improve of effectiveness of therapeutic interventions, particularly in case of a refractory disease.

## REFERENCES

1. Valera A, Balague O, Colomo L, Martinez A, Delabie J, Taddesse-Heath L, et al. IG/*MYC* rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol.* 2010 Nov;34(11):1686-94.
2. May PC, Foot N, Dunn R, Geoghegan H, Neat MJ. Detection of cryptic and variant *IGH-MYC* rearrangements in high-grade non-Hodgkin's lymphoma by fluorescence in situ hybridization: implications for cytogenetic testing. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 Apr 1;198(1):71-5.
3. Bellone M, Zaslav AL, Ahmed T, Lee HL, Ma Y, Hu Y. *IGH* amplification in patients with B cell lymphoma unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Biomark Res.* 2014 May 9;2:9.
4. Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, Visco C, Dirnhofer S, Gisin N, et al. Rearrangements of *MYC* gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol.* 2014 Jul;27(7):958-71.
5. Zhou K, Xu D, Cao Y, Wang J, Yang Y, Huang M. C-*MYC* Aberrations as Prognostic Factors in Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *PLoS One.* 2014 Apr 16;9(4):e95020.
6. Ladanyi M, Offit K, Jhanwar SC, Filippa DA, Chaganti RS. *MYC* rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood.* 1991 Mar 1;77(5):1057-63.
7. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, et al. Clinical relevance of *BCL2*, *BCL6*, and *MYC* rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998 Nov 1;92(9):3152-62.
8. Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, et al. Lymphoma / leukemia molecular profiling project. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med.* 2006 Jun 8;354(23):2431-42.

10. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma / H. Horn, M. Ziepert, C. Becher [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, No. 12. – P. 2253–2263.
11. Immunohistochemical and molecular characteristics with prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma / C. Bellas, D. Garcia, Y. Vicente [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, No. 6. – P. e98169.
9. Savage KJ, Johnson AJ, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinah P, et al. MYC gene re-arrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009 Oct 22;114(17):3533-7.
10. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013 Mar 21;121(12):2253-63.
11. Bellas C, Garcia D, Vicente Y, Kilany L, Abaira V, Navarro B, Provencio M, Martin P. Immunohistochemical and molecular characteristics with prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One*. 2014 Jun 2;9(6):e98169.

*Стаття надійшла до редакції 1.09.2014*

*Received: 1.09.2014*